Med 36

Aus der Neurologischen Universitätsklinik und -Poliklinik Hamburg
Direktor: Prof. Dr. med. Janzen

Vergleich zweier Methoden zur Differenzierung der Cholinesterasen im Gehirn

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Christian Fein
aus Kiel

Hamburg 1961

Aus der Neurologischen Universitätsklinik und -Poliklinik Hamburg
Direktor: Prof. Dr. med. Janzen

Vergleich zweier Methoden zur Differenzierung der Cholinesterasen im Gehirn

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Christian Fein
aus Kiel

Hamburg 1961

R. UNIV.
BIBLIOTH.
LEIDEN

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg am 27. 6. 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Dekan: Professor Dr. R. Pirét
Referent: Prof. Dr. Bauer
Korreferent: Prof. Dr. Jansen

Inhaltsangabe

Einleitung	Seite
Die Cholinesterasen	1
Methode	
Technik	5
Ausführung	
Ergebnisse	8
Diskussion	12
Zusammenfassung	15

Die Cholinesterasen

Alles und Hawes zeigten 1940, daß die Acetylcholin (A Ch) hydrolysierenden Fermente des Plasmas und der Erythrozyten deutliche Unterschiede aufweisen. Mendel und Rudney bestätigten 1943 diese Untersuchungen und unterschieden eine Erythrozyten-, auch wahre Cholinesterase genannt, von einer Serum- oder Pseudo-Cholinesterase.

Die beiden Fermente unterscheiden sich durch die Abhängigkeit ihrer Wirksamkeit von der Substratkonzentration. Während die E-Ch-E ihr Wirkungsoptimum bei 10^{-3} M entfaltet, wird durch eine A-Ch Konzentration von 10^{-1} M die E-Ch-E weitgehend gehemmt und die S-Ch-E erfaßt. (Mendel Rudney 1943) Die E-Ch-E spaltet ganz vorwiegend Acetyl - β Methylcholin, während Butyryl- und Propionylcholin ein spezifisches Substrat für die S-Ch-E darstellen.

In spezifischen Hemmstoffen der Ch-E findet sich ebenfalls ein wertvolles Mittel zu ihrer Differenzierung. Physostigmin und Prostigmin sind reversible selektive Hemmer der E-Ch-E. Aus der Gruppe der Alkyl-Phosphate hat die Gabe von DFP, (Diiso- propyl- fluorphosphat) TOCP (Tetraäthylpyrophosphat), Ompa (Oktometylpyrophosphoramid), Insektizide, die zuerst von Schrader synthetisiert wurden, eine irreversible Hemmung der S-Ch-E zur Folge.

Zur vergleichbaren Hemmung der E-Ch-E durch dieselben Stoffe bedarf es einer sehr viel höheren Konzentration. (Mazur u. Bodansky, 1946, Hawkins und Mendel 1949)

Eine interessante These für die Rolle der S-Ch-E im Nervengewebe ergab sich aus der Tatsache, daß die Gabe von TOCP bei Hühnern regelmäßig zu Lähmungen führt. (Earl und Thompson) Die mikroskopische Untersuchung zeigt einen Zerfall der Markscheiden. Die Annahme, daß die S-Ch-E zu der Erhaltung der Markscheiden eine wichtige Rolle spielt, konnte jedoch nicht aufrecht erhalten werden. Davison und Thompson zeigten 1954, daß andere sichere S-Ch-E-Hemmer weder Lähmungen noch Degenerationserscheinungen der Markscheiden hervorriefen. So bleibt die Funktion der S-Ch-E im Nervengewebe nach wie vor unklar.

Die E-Ch-E findet sich in Erythrozyten, den motorischen Endplatten der quergestreiften Muskulatur und allen cholinergischen Neuronen. Mit histochemischer Methode konnte Kölle feststellen, daß sich das Ferment über die ganze Länge der cholinergischen Fasern verteilt. Die S-Ch-E ist in Plasma, Leber, Pankreas, Lunge und allen glatte Muskulatur enthaltenden Organen vorhanden. Im Nervensystem findet man sie hauptsächlich in den Gliazellen. (Kölle) Thompson berichtete, daß nach Durchschneidung des Ischiadicus vom Huhn die E-Ch-E im peripheren Anteil auf O sank, während die S-Ch-E zunächst auf das Doppelte anstieg, um dann auf einen normalen Wert wieder abzusinken. Er schloß daraus, daß die E-Ch-E im Axon, die S-Ch-E in den Schwannschen Zellen lokalisiert ist. Der Anstieg dieser S-Ch-E nach Durchschneidung steht im Zusammenhang mit der Regeneration der Schwannschen Zellen. Bürgen und Chipman 1951, sowie Ord und Thompson 1952

berichteten, daß S-Ch-E hauptsächlich in der weißen Substanz lokalisiert ist.

Der Mechanismus der Ch-E-Wirkung erfolgt nach Nachmannsohn zunächst in einer Reaktion des Fermentes mit dem Substrat. Das positive Ammonium Ion des Substrates läßt es wahrscheinlich sein, daß das Enzym-protein eine negativ geladene Stelle besitzt, mit der es reagiert. Neben dieser kommt es zu einer esterartigen Bindung im Enzym-Substratkomplex. Dieser hydrolysiert in einem zweiten Schritt in das Enzym und die Zerfallsprodukte das A-Ch, wobei als Intermediärprodukt vorübergehend die acetylierte Esterase auftritt.

Beim Wiederaufbau bewirkt die Cholinacetylase durch Verbindung mit Acetyl-Coenzym A und Cholin die Übertragung der Acetylgruppe auf letzteres und macht so A-Ch und Coenzym A frei. (Nachmannsohn) Das Ferment kann auch andere Ester synthetisieren, beispielsweise Propionylcholin.

Es wurde von Nachmannsohn und Mitarbeitern in sehr reinem Zustand aus den elektrischen Organen des Zitterrochen gewonnen. M-Gewicht:3000 000.

An Methoden zur Bestimmung der Ch-E stehen als immer noch gebräuchlichste der Warburgsche Apparat zur Verfügung. Die Hydrolyse geht in einem Bicarbonat- Puffer- System vor sich. Durch die Säureproduktion wird eine äquivalente Menge CO_2 freigesetzt, die manometrisch gemessen wird.

In der colorimetrischen Methode nach de la Huerga (1952) steht eine zweite Möglichkeit der Messung von A-Ch-E

zur Verfügung. Sie beruht auf dem Entstehen einer braunen Farbe, wenn Eisenchlorid mit Essigsäure oder Acetat zusammenkommt. Diese Farbe wird photometrisch gemessen. Michel gab 1949 eine einfache Methode an. Mit einem ph Meter mass er bei der enzymatischen A-Ch-Hydrolyse in Barbitursäure-Phosphat- gepuffertem System die ph Differenz unmittelbar vor Zugabe des Substrates und nach einer festgesetzten Reaktionszeit. Der Puffer ist so gewählt, daß er seine Kapazität mit der Verringerung der Ch-E Aktivität durch den ph Abfall entsprechend verliert. Die Michelsche Methode wurde in dieser Arbeit als Vergleich benutzt.

Ihre Aufgabe war eine Kritik dieser Methode, in der die topographische Bestimmung der S-Ch-E und E-Ch-E des Gehirns mit Hilfe einer verschieden molaren A-Ch-Lösung als Substrat und einer anderen Salzkonzentration unternommen wird. Zunächst versuchten wir, eine Verbesserung der Trennung durch Hinzufügung von DFP zu erreichen.

Mazur und Bodansky stellten 1946 als erste fest, daß DFP S-Ch-E in erheblich niedrigerer Konzentration hemmt, als die E-Ch-E. Man nimmt heute allgemein an, daß dieser Hemmeffekt durch eine Hydrolyse des Alkyl-Phosphates, bei der es zu einer bleibenden Phosphorylierung des Fermentes kommt, entsteht. Kewitz (1957) injizierte Mäusen DFP und mass nach dem Tode der Tiere die Aktivität der S-Ch-E mittels Bu-Ch als Substrat. Hierbei trennte er nur allgemein weiße von grauer Substanz.

Ausgehend von den Untersuchungen (Mc Donald's, Pollard u. Gropp), die eine 10^{-3}M Lösung von A-Ch als sehr spezifisch für die E-Ch-E erkannten, wurde diese Konzentration zusammen mit DFP in den folgenden Versuchen verwandt.

Technik

Das nach der Sektion in einer Tiefkühltruhe bei -20°C aufbewahrte Gehirn wird für die Messungen seziert. Etwa vorhandenes Blut wird abgespült und die einzelnen Teile mit physiologischer Na Cl Lösung im Verhältnis 1 : 1 versetzt und homogenisiert.

Benutzt werden:

1) ph Meter mit Glaselektrode und Kalomel-Elektrode.
2) Glas-Reaktionsgefäß von 5 ccm Fassungsvermögen.
3) Thermostat mit einer konstanten Temperatur von 25° C. Darin werden in einem Drahtnetzkorb die Reaktionsgefäße festgehalten.
4) Verschiedene Pipetten.

Reagenzien:

1) Pufferlösung für E-Ch-E: 2 g Na-Veronal (0,010 M), 270 mg KH_2PO_4 (0,002 M), 44,7 g KCL (0,060 M), 7 - 8 ml 0,1 n H-Cl

werden mit Wasser ad 1000 ml aufgefüllt.
Der Puffer hat ein ph von 8,1 bei 25° C.

2) Pufferlösung für S-Ch-E: 1,2 g Na-Veronal (0,006 M), 0,13 gr KH_2PO_4 (0,001 M), 17,5 gr Na Cl (0,3 M), 11,6 ml 0,1 n H Cl ad 1000 ml. Der Puffer hat bei 25° C ein ph von 8,0.

3) Substrat:
   a) Für E-Ch-E 0,5%ige A Ch Lösung (0,0275 M)
   b) Für S-Ch-E 3%ige Lösung (0,16 M)

4) Eine 10^{-5}M Lösung von DFP.

Ausführung

0,2 ml des Gehirnextraktes werden mit einer Pipette aufgezogen und in 10 ccm Aqua dest geblasen. Hierzu werden 10 ccm Pufferlösung für die S-Ch-E hinzugefügt. Nach 10 Minuten Temperierung im Thermostaten bei 25° C wird eine erste Messung des ph vorgenommen. 10 ccm werden als Reaktionsmenge zurückbehalten, der Rest verworfen. 0,02 ml der 10^{-5}M - DFP Lösung werden hinzugefügt und das Reagenzglas wieder in den Thermostaten gebracht. Es resultiert eine 2×10^{-8}M DFP Konzentration. Nach 30 Minuten werden 1 ml 3%ige A-Ch Lösung hinzugegeben, so daß sich eine $1{,}6 \times 10^{-2}$M Konzentration des A-Ch einstellt. Es wird gut durchgeschüttelt, und nach weiteren 30 Minuten wird zum zweiten Mal der ph Wert gemessen.

Für die E-Ch-E ergeben sich andere Mengen.

0,1 ml Gehirnextrakt werden mit 4 ml Aqua dest und 4 ml Pufferlösung für die E-Ch-E in einem Reagenzglas in den Thermostaten gebracht, wo sie 10 Minuten bei 25° C verbleiben. 4 ml werden danach abpipettiert und zur Bestimmung des anfänglichen ph Wertes verwandt. 0,01 ml der 10^{-5} M DFP Lösung wird der Reaktionsmenge hinzugegeben. Danach wird das Reaktionsgemisch wieder in den Thermostaten gebracht. 30 Minuten später werden 0,4 ml 0,5%ige A-Ch Lösung, das entspricht einer endgültigen Konzentration von $2,75 \times 10^{-3}$M hinzugefügt und weitere 30 Minuten später der ph Wert gemessen. Die Versuche wurden doppelt angesetzt; ein Glas wird für die nicht-enzymatische Hydrolysebestimmung verwandt. Der Hydrolysegrad ist aus folgender Formel berechnet:

$$ph = \frac{(ph_1 - ph_2) \times 60}{t_2 - t_1} - s$$

ph_1: Wert vor der A-Ch Zugabe.

ph_2: Nach Hydrolyse.

$t_2 - t_1$: Dauer der Hydrolyse in Minuten.

s: Nicht enzymatische Hydrolyse.

t_1: Zeit der A-Ch Zugabe.

t_2: Zeit der ph Bestimmung nach Hydrolyse.

Diesen Untersuchungen waren zur Kontrolle Messungen der Erythrozyten- und Serum-Esterasen des menschlichen Blutes vorhergegangen, die mit demselben Ansatz durchgeführt wurden. Anstelle des Gehirnextraktes wurden lediglich Serum und Erythrozyten genommen.

Ergebnisse

Tabelle 1

Hemmung der Ch-E durch verschiedene Konzentrationen von DFP im menschlichen Blut.

	10^{-7}M DFP	10^{-8}M DFP	10^{-9}M DFP
S-ChE	97%	95%	60%
E-ChE	45-50%	10-13%	4%

Man ersieht bei Verwendung einer 10^{-8}M DFP Lösung eine Hemmung der Serum-Esterase von durchschnittlich 95%, während die Erythr.Esterase mit der gleichen Menge zu 10 - 13% gehemmt wurde. Dieses Ergebnis deckt sich mit denen von Hawkins und Mendel (1948) und anderen Autoren.

Die Anwendung einer 10^{-7}M Endlösung führte bei der S-Ch-E nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Hemmwirkung, verminderte jedoch die E-Ch-E Aktivität bereits auf 50-55%.

Eine 10^{-9}M Endlösung ließ die Aktivität der E-Ch-E fast unbeeinflußt, führte aber bei der S-Ch-E zu einer Hemmwirkung von nur durchschnittlich 60%.

So stellte sich aus diesen Vorversuchen eine 10^{-8}M Endlösung des DFP als die geeignete zur Differenzierung der Ch-E heraus.

Tabelle 2

Hemmung der Ch-E im menschlichen Gehirn unter Verwendung einer 10^{-8}M DFP Endlösung.

	S-Ch-E ohne DFP	S-Ch-E mit DFP	% Hemmung	E-Ch-E ohne DFP	E-Ch-E mit DFP	% Hemmung
	Putamen					
4 ph:	2,83	2,03	29,3	1,24	1,22	1,6
	2,68	1,86	31,6	1,03	0,92	11,7
				1,32	1,30	1,6
	Hypothalamus					
	0,49	0,37	25,5	0,41	0,29	29,3
	0,60	0,35	42,7	0,54	0,33	39,9
	Pedunculi in Höhe der Subst.nigra.					
	0,38	0,17	56,3	0,57	0,24	57,2
	0,46	0,26	44,5	0,39	0,25	49,5
	Hinterer Thalamus und Pedunculi					
	0,26	0,18	35,6	0,20	0,15	25,0
	0,27	0,17	37,0	0,18	0,10	45,0
	Rinde (Parietalregion)					
	0,19	0,18	5	0,24	0,11	55
	0,19	0,17	11	0,20	0,09	55

Die Untersuchung ergibt, daß DFP im menschlichen Gehirn eine nicht annähernd so selektive Wirkung zeigt wie im Blut. Während im Putamen noch eine geringe Differenz in der Ch-E Hemmung auftritt, ist in den anderen Regionen mit niedrigeren Esterasewerten eine Selektivität nicht mehr feststellbar. Dieser Befund kontrastiert auffallend mit dem, der im Blut erhoben werden konnte. Er legt den Gedanken nahe, daß aus

der Familie von verschiedenen Enzymen der S-Ch-E, wie Thompson und Augustinsson sie im Gehrin annehmen, nur wenige von DFP gehemmt werden und daß die E-Ch-E mit der 10^{-3}M A-Ch-Lösung nicht so spezifisch erfaßt wird, wie dies im Blut geschieht.

In einem zweiten Ansatz wurde statt eines selektiven Inhibitors ein selektives Substrat, und zwar das Bu-Ch in 1,5%iger Lösung verwandt. Als Vergleich wurde wiederum die Differenzierung der Esterasen mit verschiedener molarer A-Ch-Konzentration nach Michel genommen.

Die Reaktionsmenge setzt sich aus den gleichen Reagenzien zusammen wie im vorherigen Versuch. In zwei weiteren Reagenzgläsern wird statt der 3%igen A-Ch-Lösung eine 1,5%ige Bu-Ch Lösung genommen. Die Versuche wurden an 4 Gehirnen durchgeführt.

Tabelle 3

Ch-E Aktivitäten im menschlichen Gehirn unter Benutzung von 1,5% Bu-Ch und 3% A-Ch zur Bestimmung der S-Ch-E und 0,5% A-Ch zur Messung der E - Ch-E.

Putamen

S-Ch-E: 1,5% Bu-Ch	S-Ch-E: 3%ig A-Ch	E-Ch-E: 0,5%ige A-Ch
Δ ph: 0,20	Δ ph: 2,73	Δ ph: 1,40
0,20	2,82	1,42
0,16	2,78	1,39
0,16	2,78	1,53
0,24	2,47	1,21
0,36	2,51	1,21

S-Ch-E: 1,5% Bu-Ch	S-Ch-E: 3%ig A-Ch	E-Ch-E: 0,5%ige A-Ch
	Caudatum	
Δ ph: 0,20	Δ ph: 2,77	Δ ph: 1,25
0,20	2,77	1,31
0,20	2,61	1,28
0,19	2,69	1,28
0,19	2,48	1,39
0,11	2,41	1,27
0,10	2,49	1,46
0,08	2,60	1,43
	Glob. Pallidum	
0,11	2,11	1,25
0,11	2,03	1,27
0,16	1,89	1,30
0,09	1,89	1,30
	Thalamus	
0,02	0,26	0,25
0,02	0,28	0,25
0,17	0,40	0,32
0,17	0,40	0,32
0,06	0,24	0,19
0,07	0,28	0,20
0,11	0,28	0,18
0,10	0,31	0,17
	Graue Substanz Kl.H.	
0,12	1,58	1,23
0,09	1,54	1,19
	1,19	
	1,25	
	Graue Substanz Gr.H.	
0,16	0,17	0,11
0,10	0,22	0,09
0,13	0,17	0,19
0,05	0,17	0,11

S-Ch-E: 1,5% Bu-Ch S-Ch-E: 3% A-Ch E-Ch-E: 0,5% A-Ch

Weiße Substanz
aus allen Regionen genommen

Δ ph	0,15	0,21	0,11
	0,08	0,20	0,11
	0,06	0,19	0,16
	0,07	0,30	0,24

Parietale

0,03	0,17	0,10
0,02	0,17	0,10

Frontale

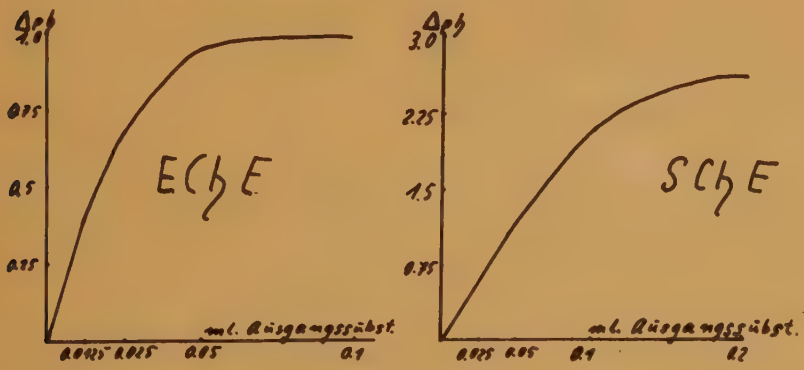
0,05	0,17	0,13
0,10	0,20	0,10

Diskussion

Diese Resultate der Tabelle 3 zeigen deutlich, daß die bisherige Messung der S-Ch-E mit dem unspezifischen A-Ch als Substrat ungenügend ist. So liegen die Werte in den Stammganglien nur bei 5 - 10% der mit der Michelschen Methode gemessenen S-Ch-E Aktivität. Aber auch in anderen Regionen ist die Differenz zwischen den Ergebnissen mit A-Ch als Substrat und mit Bu-Ch als Substrat augenscheinlich. Bei einem Vergleich der mit der Michelschen Methode gewonnenen Werte dieser Arbeit mit anderen Arbeiten wie Bauer (1960) besteht bei den niedrigeren Esterasewerten des Glob.Pallidum, der Kleinhirnrinde und allen anderen folgenden Übereinstimmung. Die Regionen des Putamen und Caudatum zeigen jedoch geringere

Werte der E-Ch-E und S-Ch-E,sowie ein Überwiegen der S-Ch-E über die E-Ch-E, umgerechnet auf die gleiche Ausgangsmenge der Gehirnsubstanz. Dies erklärt sich aus der Hemmung der Esterasen, besonders der E-Ch-E, durch den starken ph Abfall, der durch die Reaktionsmenge von 50 mg hervorgerufen wird.

Aus der Arbeit von Bauer ist ersichtlich, daß die S-Ch-E von einem Δ ph 2,0 an stark in ihrer Aktivität gehemmt wird. Bei der E-Ch-E liegt der Leistungsabfall bei einem Δ ph von 1,0.



Bei einer Beachtung jener ph Werte, die durch geringere Ausgangsmengen gewonnen und dann entsprechend umgerechnet wurden, wird die Unspezifizität der Michelschen Methode noch augenscheinlicher. Die mit Bu-Ch gemessene Aktivität der S-Ch-E ist hierbei 20 mal geringer als die mit A-Ch gemessene.

Ein weiterer Grund hierfür dürfte in der benutzten Konzentration des A-Ch liegen, die in dieser Arbeit und anderen aus der Literatur wie Michel (1948), Augustinsson (1948), Meyer und Wilbrandt (1954), Bauer (1960) und anderen $1{,}6 \times 10^{-2}$M beträgt, während sie optimal 10^{-1}M ausmacht. So wird ein beträchtlicher Teil der E-Ch-E in der Michelschen Methode miterfaßt.

Ein Vergleich mit anderen Arbeiten über die Verteilung der Ch-E im Gehirn ergibt, daß nur wenige aus der großen Zahl eine Unterscheidung in S-Ch-E und E-Ch-E vornehmen. Ferner wird in vielen Arbeiten mit Gehirnen von Ratten und Meerschweinchen eine Aufgliederung der verschiedenen Gehirnregionen unterlassen.

Unter den vergleichbaren Arbeiten fallen als abweichend die hohen Werte der mit Bu-Ch gemessenen S-Ch-E Aktivität heraus, die Ord und Thompson in der weißen Substanz des menschlichen Gehirns fanden. (1952) Cavanagh, Thompson und Webster bestätigten 1954 diese Ergebnisse. Zu gleichen Verhältnissen kamen Ord und Thompson auch bei der Ratte. (1950) Hard und Peterson berichten dagegen,daß mit histochemischer Methode in der weißen Substanz des Hundes keine S-Ch-E oder E-Ch-E nachzuweisen ist. Dieser Bericht deckt sich mit denen von Little (1950) und Burgen und Chipman (1952). Koelle (1950) zeigte, daß auch die weiße Substanz des Rückenmarkes von der Katze nur minimale S-Ch-E Werte aufweist.

Weiteren Untersuchungen mit Bu-Ch, das sich dem noch häufig verwandten A-Ch in der Bestimmung der S-Ch-E überlegen

zeigt,und mit der 10^{-3}M A-Ch Lösung für die E-Ch-E, deren Wert bestehen bleibt, muß die Klärung dieser Differenzen vorbehalten bleiben.

Das Fehlen der Selektivität von DFP im Gehirngewebe, wie es die Tabelle 2 zeigt, ist wegen seiner guten Hemmwirkung auf die S-Ch-E des menschlichen Blutes bemerkenswert. Über den Wert anderer Inhibitoren im Gehirngewebe ist damit nichts gesagt, doch zeigten Burgen und Chipman (1952), daß TEPP im Gehirn des Hundes ebenfalls nur unspezifisch hemmt.

Zusammenfassung

Einleitend wurde ein Überblick über Vorkommen und Unterscheidungsmerkmale der Ch-E gegeben. Ihr Wirkungsmechanismus wurde kurz dargestellt. Die colorimetrischen und manometrischen Methoden zur Bestimmung der Ch-E wurdenerläutert,sowie diein dieser Arbeit verwandte potentiometrische Methode nach Michel ausführlich dargestellt. DFP wurde in seiner Hemmwirkung auf die Ch-E geprüft. Hierbei stellte sich heraus, daß die gute selektive Hemmwirkung auf die S-Ch-E des menschlichen Blutes im Gehirn nicht auftritt, so daß DFP als Mittel zur Differenzierung der menschlichen Gehirn Ch-E ungeeignet erscheint.

In Tabelle 3 wurde Bu-Ch und A-Ch als Substrat der S-Ch-E vergleichend benutzt und festgestellt, daß das spezifische Bu-Ch erheblich niedrigere Werte für die S-Ch-E liefert, als sie die noch häufig verwandte Michelsche Methode

aufweist. Anschließend wurde die Literatur über die Verteilung der Ch-E im Gehirn, soweit sie hier von Interesse war, aufgeführt.

Literaturverzeichnis

Alles u. Hawes:	Cholinesterase in the blood of man. J.Biol.Chem. 133 : 375 (1940)
Augustinsson, K.B.:	Cholinesterase. A study in comparative enzymology. Acta physiol.scand. Vol.15. Suppl.51 p 1-182 (1948)
Bauer:	Archiv für Gewerbepathologie und Gewerbehygiene 1960
Burgen u. Chipman:	Cholinesterase and succinic dehydrase in central nervous system of dog. J.physiol. 114 : 296 (1951)
Burgen u. Chipman:	Cholinesterase. Localization in central nervous system. Quart.J.exper.Physiol. 37 : 61 (1952)
Cavanagh, Thompson Webster:	Localization of pseudocholinesterase in nervous tissue. Quart.J.exper.Physiol. 39 : 185 (1954)
de la Huerga:	Colorimetric method for determination of serum-cholinesterase. Am.J.Clin.Path. 22 : 1126 (1952)
Earl u. Thompson:	Cholinesterase levels in nervous system in tri-o-cresylphosphate poisoning. Brit.J.Pharmacol. 7 : 685 (1952)
Hard u. Peterson:	Distribution of cholinesterase in nerve tissue of dog. Anat.Rec. 108 57 : 69 Sept. 1950
Hawkins u. Mendel B.:	Studies on Cholinesterase. VI. The selektive inhibition of true cholinesterase in vivo. Biochem.J. 44 : 260 (1949)
Hawkins u. Mendel:	Selektive inhibition of pseudo-cholinesterase by di-isopropylfluorphosphate. Brit.J.Pharmacol 2 : 173 (1947)
Hawkins:	Folic acid and cholinesterases. Arch.Biochem. 17 : 97 (1948)
Kewitz:	Klin.Wochenschrift 35 (1957)
Koelle:	Histochemical differentiation of types of cholinesterases and their localizations in tissues of cat. J.Pharmakol. u. Exper .Therap. 100 : 158 (1950)

Little: Cholinesterase distribution of two fractions in homogenates of portions of dog brain. Am. J.Physiol. 155 : 60 (1948)

Mazur u. Bodansky O.: Mechanism of in vitro and in vivo Inhibition of cholinesterase activity by DFP. J.Biol.Chem. 163 : 261 (1946)

Mc.Donald, Pollard Gropp: A rapid mikromethod for electrometric determination of red cell cholinesteras activity in whole blood. A.M.A. Arch. industr.Hyg.occup.Med. 6 : 3 (1952)

Mendel u. Rudney: Types of cholinesterase present in brain tissue. Science 98 : 201 (1943)

Meyer u. Wilbrandt: Determination of activity of cholineste- rase in human blood. Helvet.physiol of pharmacol. acta. 12 : 206 (1954)

Michel, H.O.: An electrometric method for the determi- nation of red blood cell and plasma cholinesterase activity. J.Lab.clin.Med. 34 : 1546 (1949)

Nachmannsohn: Academic Press N.Y. 1959

Ord u. Thompson: Pseudo-cholinesterase activity in centr nervous system. Biochem.J. 51 : 245 (1952)

Ord u. Thompson: The distribution of cholinesterase type in mammalian tissues. Biochem.J. 46 : 346 (1950)

Die Untersuchungen wurden an der Neurologischen Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof.Dr. J a n z e n , daß er mir die Arbeit an seiner Klinik ermöglichte.

Herrn Dr.med. B a u e r danke ich ebenfalls für seinen Rat und seine Unterstützung.

Lebenslauf

Am 5. Mai 1935 wurde ich in Kiel als Sohn des Korvettenkapitäns Otto Fein und seiner Ehefrau Ruth geb. Schnaase geboren. In Eisenberg/Thüringen, Kampen/Sylt und Hamburg-Kl.Flottbek besuchte ich die Volksschule. In Hamburg machte ich auch das Examen für die Aufnahme ins Gymnasium, das ich 1955 mit dem Reifezeugnis verließ.

In Tübingen studierte ich 5 vorklinische Semester, machte dort das Physikum, studierte dann zwei klinische Semester in München und wechselte dann nach Hamburg über, wo ich nach Absolvierung der letzten klinischen Semester am 10. Januar 1961 die ärztliche Prüfung bestand.

Druck: Photo-Copie GmbH Hamburg 1